



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0002922
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 01월 16일
Date of Application JAN 16, 2003

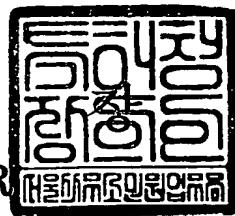
출 원 인 : (주)코스타 월드
Applicant(s) KOSTARWORLD



2003 년 10 월 22 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2003.01.16
【발명의 명칭】	포르피린 화합물
【발명의 영문명칭】	PORPHYRIN DERIVATIVES
【출원인】	
【명칭】	(주)코스타 월드
【출원인코드】	1-1998-714587-8
【대리인】	
【성명】	유동옥
【대리인코드】	9-2000-000023-2
【포괄위임등록번호】	2002-050048-7
【발명자】	
【성명】	이창희
【출원인코드】	4-2002-024684-2
【발명자】	
【성명】	김용록
【출원인코드】	4-2002-024682-0
【발명자】	
【성명】	이원영
【출원인코드】	4-1995-043895-9
【발명자】	
【성명】	이대운
【출원인코드】	4-2002-024679-7
【발명자】	
【성명】	고시환
【출원인코드】	4-2002-024677-4
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 유동옥 (인)

20030002922

출력 일자: 2003/10/23

【수수료】

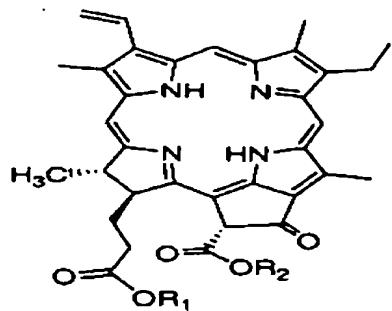
【기본출원료】	19	면	29,000	원
【가산출원료】	0	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	3	항	205,000	원
【합계】			234,000	원

【요약서】

【요약】

본 발명은 광역학치료법(PDT)에 사용되는 광민감성 물질로서, 하기 화학식1로 표시되는 포르피린(porphyrin) 화합물 또는 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

화학식 1



상기 식에서, R₁, R₂ 는 알킬기, 폴리에틸렌글리콜, 알콕시 또는 술폰기를 나타내고, 상기 알킬기, 알콕시기는 탄소원자수 1 내지 6의 직쇄 또는 분쇄의 탄화수소고리를 나타내며, 또한, 상기 화합물은 니켈을 포함하는 전이금속의 촉매일 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

포르피린(porphyrin), PDT

【명세서】**【발명의 명칭】**

포르피린 화합물{PORPHYRIN DERIVATIVES}

【도면의 간단한 설명】

도1은 본 발명의 화학식2 화합물의 UV 스펙트럼

도2는 화학식2 화합물의 단일항 산소 인광 측정결과

도3은 마우스 유래 EMT6 세포에 대한 세포 독성을 MTT assay 법으로 측정한 결과

도4는 세포 사멸의 기전을 연구하기 위하여 Annexin V/PI 염색을 실시한 결과

도5는 배양농도에 따른 세포독성 그래프

도6은 배양시간에 따른 세포독성 그래프

도7은 빛의 조사세기에 따른 세포독성을 시험한 그래프

도8은 EMT6 세포내의 미토콘드리아막 포텐셜(MMP)를 측정한 그래프

도9는 EMT6 세포로 유발된 마우스 종양에서 DH-I-180-3의 종양 억제 그래프

도10은 EMT6 세포로 유발된 마우스에서 DH-I-180-3에 의한 생존곡선

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <11> 본 발명은 광역학치료법(PDT)에 사용되는 광민감성 물질로서, 하기 화학식1로 표시되는 포르피린 화합물 또는 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

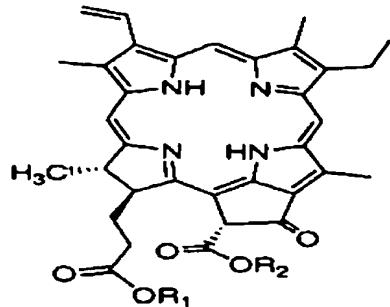


20030002922

출력 일자: 2003/10/23

<12> 화학식 1

<13>



<14> 상기 식에서, R_1 , R_2 는 알킬기, 폴리에틸렌글리콜, 알콕시 또는 술폰기를 나타내고, 상기 알킬기, 알콕시기는 탄소원자수 1 내지 6의 직쇄 또는 분쇄의 탄화수소고리를 나타내며, 또한, 상기 화합물은 니켈을 포함하는 전이금속의 착물일 수 있다.

<15> 광역학 치료법이란, 암세포나 각종 종양에 대한 선택성 및 광활성을 가지는 광민감성 물질(photosensitizer)을 이용하여 수술을 시행하지 않고 암 등의 난치병을 치료할 수 있는 기술의 하나로서, 화학요법제와는 달리 부작용이 거의 없는 획기적인 종양치료법이다.

<16> 예를들어, 광민감제의 치료기작은 상기의 광민감성 물질을 정맥주사에 의해 대상자에 투여하고, 이에 적절한 광(light)을 조사함으로써, 여기된 광민감성 물질이 산소분자를 활성화시켜 그것을 단일항(singlet) 상태의 산소로 변환시키거나, 새로운 라디칼을 만들거나 혹은 새로운 화학종을 만들어 암세포나 각종 종양조직만을 선택적으로 공격 또는 궤멸시키는 것이다.

<17> 이러한 광민감성 물질로는 포르피린(porphyrin)류의 화합물이 대표적인데, 누에의 잠분이나 뽕잎 및 녹조류 등에서 추출되는 포르피린계 화합물은 광민감성 물질로 사용하기에 적합한 분광학적 특성을 갖고 있고, 가장 중요한 성질은 비교적 세포 투과력이 큰 적색광선(700~900nm)에 의해 전자전이를 일으키는 성질과 3중항 여기상태를 효율적으로 생성할 수 있다

- <18> 광민감성 물질로서의 포르피린 유도체는 암세포나 종양조직에 선택적으로 침투 및 축적될 뿐만 아니라 화합물의 특징상 형광이나 인광을 나타내므로 종양의 조기진단용 물질로 활용되기도 한다.
- <19> 포르피린 관련기술로서, 미국 특허(U.S. Pat. Nos. 5,633,275, 5,654,423, 5,675,001, 5,703,230 및 5,705,622)와 포토프린Ⅱ에 관한 미국 특허(U.S. Pat. No. 4,882,234)의 물질은 이미 시장에 나와 있고, 일부는 여러 임상단계에 올라 있는 것으로 알려지고 있는데, 상기 포토프린Ⅱ는 헤마토포르피린(HpD)이 에스테르결합으로 연결된 올리고머로 이루어진 혼합물이다.
- <20> 또한, BPDMA(verteporphin, WO 97/29915)는 벤조포르피린 유도체로서 현재 피부암과 건선 및 노인성 황반퇴화(AMD)에 특별한 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 식도 및 기관지 암의 치료에 유용한 가능성이 타진되는 m-THPC(WO 97/48393) 또는 모노아스파틸클로린(CA 2121716; JP 09071531)은 클로린 유도체들로서 클로린 유도체도 PDT에 효과적인 물질로서 다수가 특허파일에 등록되어 있는 상황이다.(WO 97/19081, WO 97/32885; EP 569113; U.S. Pat. Nos. 5,587,394, 5,648,485, 5,693,632)
- <21> 이러한 포르피린계 화합물은 대부분이 메조-테트라페닐포르피린(TPP)의 유도체이거나 클로린계, 클로로필계, 푸르푸린계, 베르딘 및 딜스-알더 부가물 등이 주종을 이루며, 비 포르피린계 물질로는 5-아미노레블루산 및 프탈로시아닌 등이 있다.
- <22> 여기서, 단일항 산소분자를 생성시키는 수율은 세포독성효과와 직접 관련이 있기 때문에, 단일항산소 생성에 대한 효율이 높으면 더욱 효과적인 세포독성효과를 나타낼 수 있는 것이다.

<23> 이것은 인체잔류시간과 더불어 광역학 치료에 아주 중요한 요소로서, 개선의 여지를 많이 남겨두고 있다고 볼 수 있다.

<24> 그런데, 광민감성 물질로서 현재 임상적으로 많이 사용되고 있는 상기 포토프린은, 광민감성 물질의 인체 체류시간이 길어 광독성이 크고, 제품의 가격이 상당히 고가인 단점이 있으며, 양자수율 또한 개선의 여지가 많다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

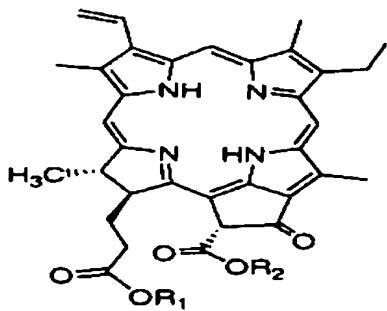
<25> 따라서, 본 발명에서는, 상기 종래의 광민감성 물질의 단점을 개선한 것으로, 유기합성을 통하여 얻어진 새로운 변형된 클로린계 물질로서, 단일항 상태의 산소를 생성시키는 양자수율이 우수하고 물리적 안정성이 좋으며, 기존의 포토프린보다 세포독성효과가 우수한 포르피린화합물 또는 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<26> 본 발명은 광역학치료법(PDT)에 사용되는 광민감성 물질로서, 하기 화학식1로 표시되는 포르피린 화합물 또는 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

<27> 화학식 1

<28>



<29> 상기 식에서, R₁, R₂ 는 각각 상기에서 정의한 바와 같다. 또한, 상기 화합물은 니켈을 포함하는 전이금속의 착물일 수 있다.

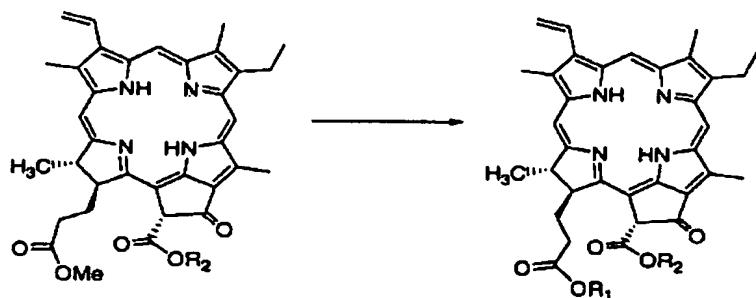
<30> 상기 본 발명의 화학식1에서, 특히 R_1 , R_2 가 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소프로필, 에틸렌글리콜, 디에틸렌글리콜, 트리에틸렌글리콜, 테트라에틸렌글리콜, 헵타에틸렌글리콜 또는 메톡시트리에틸렌글리콜기가 바람직하며, 상기 R_1 과 R_2 는 같지 않는 것이 좋다.

<31> 이하, 반응식을 통해 본 발명을 좀더 상세히 설명한다.

<32> 본 발명의 화학식1의 포르피린 화합물 또는 그 염은, 건조된 잠분 또는 녹조류로부터 유기용매(물, 클로로포름, 알코올, 아세톤)를 이용하여 페오피틴(pheophytin) a 또는 10-히드록시페오피틴 a 를 추출하고, 관크로마토그래피, TLC 등으로 분리하고, 이들을 산 또는 염기의 존재하에서 실온 또는 환류의 조건에서 메탄올과 반응시켜 페오포바이드(pheophorbide) a 메틸에스테르 또는 10-히드록시페오포바이드 a 메틸에스테르를 얻은 다음, 이를 출발물질로 사용하여 질소기류하에서 빛이 차단된 상태에서 반응시켜 얻는다.

<33> 반응식

<34>



<35> (화학식 0) (화학식 1)

<36> 상기 식에서, R_1 , R_2 는 상기한 바와 같다. 구체적인 반응공정을 실시예를 통해서 알아본다.

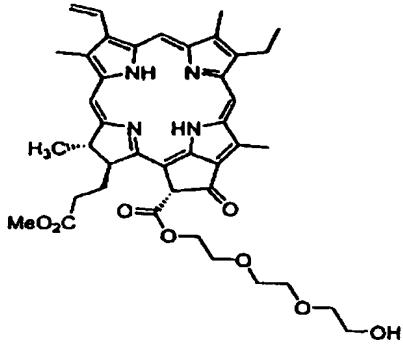
<37> 실시 예

<38> 반응용기에 메틸페오포바이드 a 메틸에스테르(화학식 0) 100mg, 피리딘 16mg과 툴루엔 15mL를 넣는다. 여기에 트리에틸렌글리콜 0.033mL를 넣고 질소기류하에서 16시간 동안 가열한다.

<39> 메틸렌클로라이드로 추출하고 용매를 제거한 후, 남은 물질을 관크로마토그래피로 분리하여, 하기 화학식2의 화합물 73mg을 얻었다. 이 화합물을 DH-I-180-3이라 칭한다. 도1에 DH-I-180-3의 UV 스펙트럼을 나타낸다.

<40> 화학식 2(DH-I-180-3)

<41>



<42>

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.53 (s, 1H, meso-H), 9.40 (s, 1H, meso-H), 8.57 (s, 1H, meso-H), 8.00 (dd, 1H, J = 6.3, 11.5 Hz, CH₂=CH), 6.30 (d, 1H, J = 18.1 Hz, CH=CH₂), 6.27 (s, 1H, CH), 6.19 (d, 1H, J = 12.8 Hz, CH=CH₂), 4.49-4.45 (m, 3H, CH and OCH₂), 4.26-4.24 (m, 1H, CH), 3.72-3.66 (m, 4H, CH₂ and OCH₂), 3.69 (s, 3H, CH₃), 3.55 (s, 3H, OCH₃), 3.49-3.39 (m, 4H, CH₂OCH₂), 3.41 (s, 3H, CH₃), 3.31 (t, 2H, J = 4.6 Hz, CH₂), 3.26-3.23 (m, 5H, CH₂ and CH₃), 2.66-2.21 (m, 5H, CH₂CH₂ and OH), 1.82 (d, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃), 1.70 (t, 3H, J = 7.6 Hz, CH₃), 0.54 (br s, 1H, N-H), -1.62 (br s, 1H, N-H).

<43>

상기 화학식2의 DH-I-180-3에 대한 단일항 산소 측정을 하였다.

<44>

실험조건은, 에어포화상태(99.999% 고순도 공기 사용)에서 용매는 툴루엔(미크사, HPLC grade), 용액 중의 산소농도 2.1 × 10⁻³ M, 온도는 21°C였다.



0002922

출력 일자: 2003/10/23

- <45> 단일항 산소 인광 측정결과(λ excitation = 508nm)를 도2에 나타냈고, 이로부터 계산한 양자수율은 0.60(5%)로서, 단일항 상태의 산소를 생성시키는 양자수율이 우수하고 물리적 안정성이 양호함을 확인하였다.
- <46> 시험예(동물시험)
- <47> 상기 화학식2의 DH-I-180-3를 이용하여 동물시험을 실시하되, 현재 유통되고 있는 포토 젬(photogem, 상품명, 통상의 포토프린)을 대조군으로 사용하였다.
- <48> 우선, 유방암 세포(EMT6 ; 1×10^6 cells/마우스)를 BALB/c 마우스(군 당 12마리)에 이식하고, 7~10일 후 1% Tween 80으로 희석한 DH-I-180-3(각 마우스 당 0.4, 0.8 mg/kg)과 주사용 증류수로 희석한 포토젬(각 마우스 당 2 mg/kg)을 정맥 주사하였다.
- <49> 주사 3시간 후 마우스를 마취시켜 할로겐 램프를 이용하여 1.2 J로 조사하고 2~3일 간격으로 캘리퍼를 이용하여 종양의 크기를 측정함은 물론, 동시에 그에 따른 마우스의 생존율을 측정하였다.
- <50> 시험예(in vitro)
- <51> 유방암 세포(EMT6)를 배양하여(배양배지 ; DMEM + 10% FBS + 100U penicillin + 100 μ g streptomycin) 실험에 사용하였다.
- <52> 세포를 상기 배지에서 배양한 후 0.25% 트립신 - EDTA를 처리하여 세포를 수거한 후 트립판 블루를 이용해 세포를 계수한다.
- <53> 2 $\times 10^5$ cells/ml의 농도로 세포를 35 mm culture dish에 3 ml첨가하여 24시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 모든 세포가 dish에 단층이 되게 한다.

- <54> DMF에 용해한 DH-I-180-3를 여러 농도로 희석하여 35 mm culture dish에 첨가하였다. 이 때, DMF에 의한 효과를 배제하기 위하여 사용한 DMF의 농도는 0.5%를 넘지 않았다.
- <55> 광민감성 물질을 세포에 첨가하고 1시간 후, 할로겐 램프를 이용하여 1.2 J의 농도로 빛을 조사하였다. 빛을 조사한 다음, culture dish를 배양기로 옮겨 배양하였다.
- <56> PDT에 의한 세포독성을 24시간 후에 MTT assay를 이용하여 분석하였고, 세포의 형태는 광학현미경을 통해 관찰하였다.
- <57> 상기 본 발명의 광민감성 물질(DH-I-180-3)을 시험함에 있어서는, 대조군으로 기존의 포토џェ임을 통해 비교 실험하고, 물질의 농도와 빛의 조사세기 및 물질의 흡수시간 등에 변화를 주어 시험했다.
- <58> 도3에는 마우스 유래 EMT6 세포에 대한 세포 독성을 MTT assay 법으로 측정한 결과를 나타내었다.
- <59> 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 대조군(control), 빛만 조사할 때(light), 용매만 처리했을 경우(DMF), 빛이 없을 때(ps(2) only), 그리고 본 발명의 광민감성 물질(DH-I-180-3)의 농도를 다양화하여 측정한 결과, 빛과 용매 및 광민감성 물질만 처리했을 경우에는 전혀 세포 독성을 보이지 않은 반면, DH-I-180-3의 함량이 0.2 μg 일 때 현저한 세포독성이 나타나고, 0.4 μg 에서 LD100 이 나타나 최적효능농도가 0.4 μg 임을 확인할 수 있었다.
- <60> 도4에는 세포 사멸의 기전을 연구하기 위하여 Annexin V/PI 염색을 실시한 결과가 나타나 있으며, 도면에서와 같이, 대조군에서는 90%이상이 생존해 있는 반면, PDT 처리군(0.4 μg /1hr)에서는 50~60% 이상 세포가 고사(cell apoptosis)됨으로써 EMT6 세포가 사멸되고 있음을 확인할 수 있다.

- <61> 도5는 광민감제의 농도를 달리했을 때, 세포내에 얼마나 많이 축적(uptake)되는 가를 측정한 도표로서, 광민감제의 세포내 농도를 FACs분석을 통하여 살펴본 결과, 다분히 농도 의존성이 강하며, 세포독성과 비교하여 보았을 때 상관관계가 있으며, 최소한 208.92 MFI(평균형광강도), 즉, 본 발명의 광민감성 물질 DH-I-180-3의 농도가 0.4 μg 은 되어야만 세포독성이 강하게 나타남을 알 수 있다.
- <62> 도6은 광민감제의 시간에 따른 세포축적율을 나타낸 도표로서, 세포에 광민감성 물질을 첨가하고 시간에 따라 FACs분석을 통하여 살펴본 결과, 시간에 의존적임을 알 수 있고, 세포독성과 비교하여 살펴볼 때, 최소한 MFI가 208.92, 즉, 시간이 최소 60분은 되어야만 세포독성이 강하게 나타났다.
- <63> 도7은 빛의 조사세기에 따른 세포독성을 시험한 도표로서, 조사하는 빛의 세기가 1.2 J 일 때 가장 좋고, 그 이상이 되어도 더 이상의 효과는 없는 것을 알 수 있다.
- <64> 도8은 EMT6 세포내의 미토콘드리아막 포텐셜(MMP)을 측정한 그림으로서, PDT 처리 후 세포의 MMP를 측정하기 위하여 JC-1 dye로 염색하여 FACs 분석을 수행한 결과, PDT에 의해 MMP가 강하게 소실되는 것을 볼 수 있고, 이러한 결과는 형광현미경에 의한 관찰과 일치하였다.
- <65> 한편, 도9는 DH-I-180-3으로 처리된 EMT6 세포에 의해 종양이 유발된 BALB/c 마우스의 종양 억제를 나타낸 도표로서, 본 발명의 광민감성 물질로 처리한 군은 대조군 및 포토프린(포토젬) 처리군과 비교하여, 처리 후 시간이 경과하면서 EMT6 세포의 종양성장율이 현저히 줄어들었다.
- <66> 도10은 도9의 결과에 의해서 도출된 마우스의 생존곡선으로, PDT로 인해 생존율이 대조군에 비해서 연장된 결과를 나타낸 것이다.

<67> 이상의 각 시험결과를 토대로, 본 발명의 광민감성 물질(DH-I-180-3)의 최적처리조건은, PDT에 사용한 광민감성 물질의 농도는 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$, 세포내의 흡수는 1시간, 빛의 조사강도는 1.2 J, 그리고 활성결과의 분석은 24시간이면 충분하였다.

<68> 대조군으로 사용한 포토젬(혹은 포토프린)은 사용된 농도가 $50\sim100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이고, 24시간 이 지나도 세포내 흡수는 효과적이지 못하고, 빛의 조사강도도 본 발명의 DH-I-180-3에 비하여 10~100배 이상이어야 함을 알 수 있어, 결국 본 발명의 광민감성 물질(DH-I-180-3)의 우수성을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

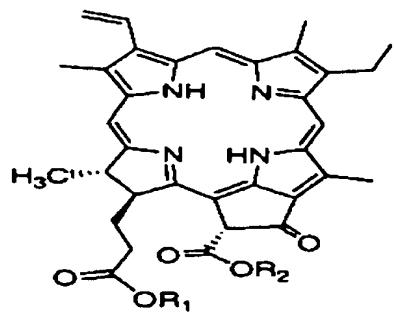
<69> 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 화학식1의 포르피린 화합물 또는 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염에 따르면, 기존의 광민감성 물질의 단점을 개선한 것으로, 단일항 상태의 산소를 생성시키는 양자수율이 우수하고 물리적 안정성이 좋으며, 기존의 포토프린보다 세포독성효과가 우수하여 관련 분야에의 이용 및 응용이 가능하다 하겠다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식1로 표시되는 포르피린 화합물 또는 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염.

화학식 1

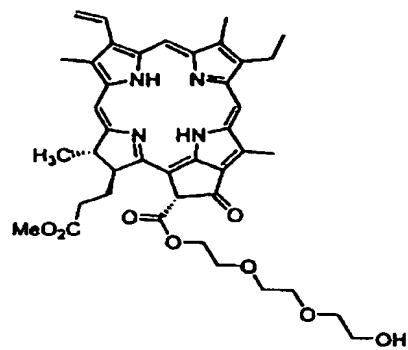


상기 식에서, R_1 , R_2 는 알킬기, 폴리에틸렌글리콜, 알콕시 또는 슬픈기를 나타내고, 상기 알킬기, 알콕시기는 탄소원자수 1 내지 6의 직쇄 또는 분쇄의 탄화수소고리를 나타내며, 또한, 상기 화합물은 니켈을 포함하는 전이금속의 착물일 수 있다.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

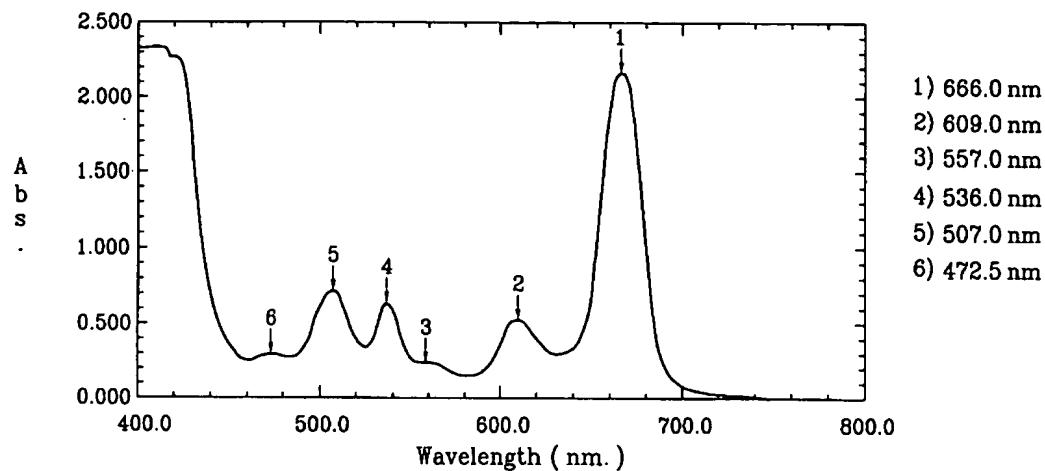
상기 화합물은 하기 화학식2로 표시되는 것을 특징으로 하는 포르피린 화합물 또는 그 것의 약제학적으로 허용 가능한 염.

**【청구항 3】**

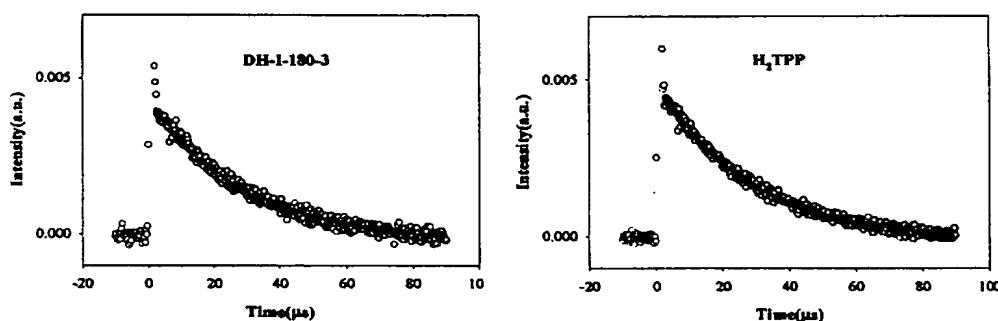
유효성분으로서 제1항에 따른 포르피린 화합물 또는 그것의 약제학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 광역학적 진단 및/또는 치료제

【도면】

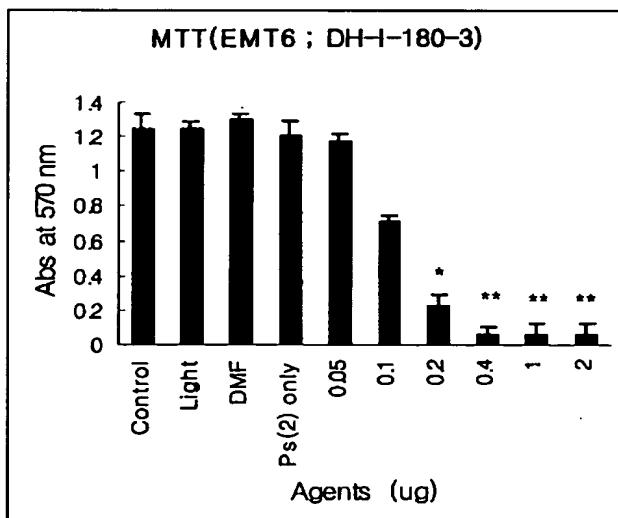
【도 1】



【도 2】

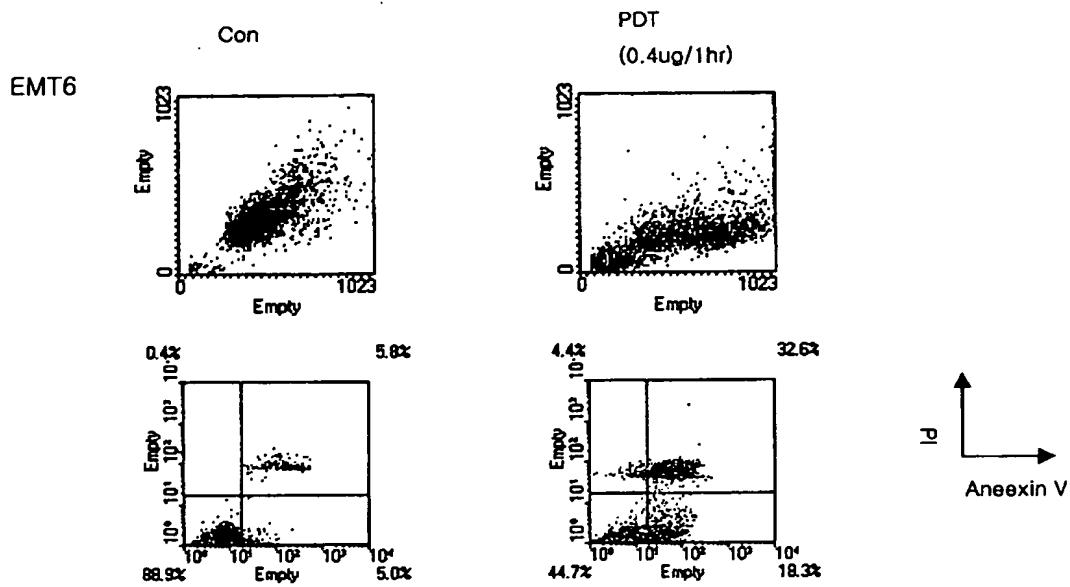


【도 3】

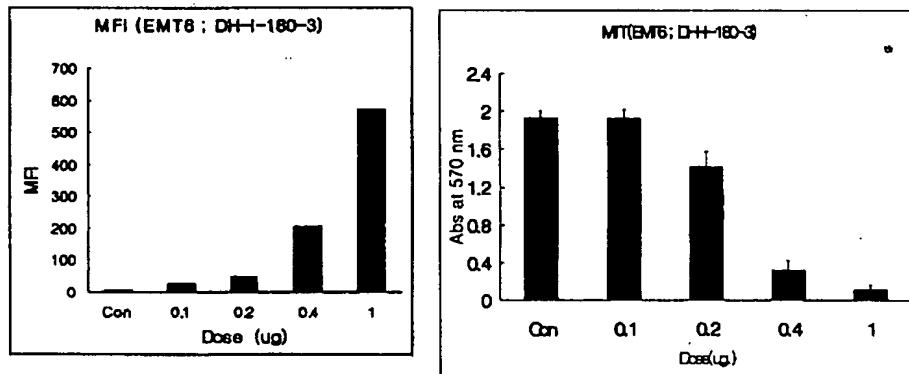


BEST AVAILABLE COPY

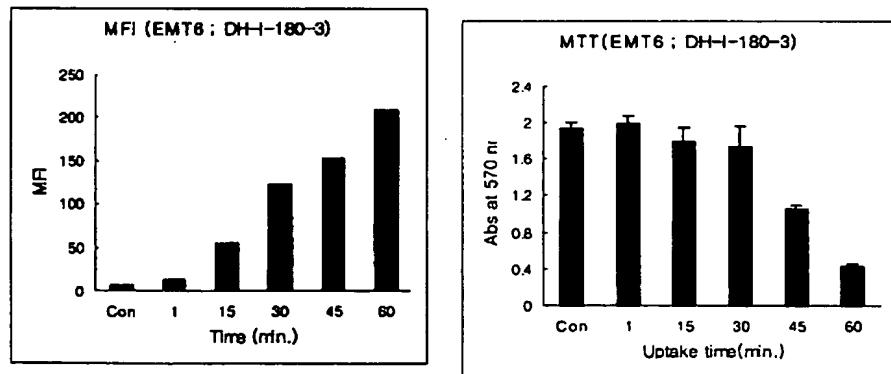
【도 4】



【도 5】

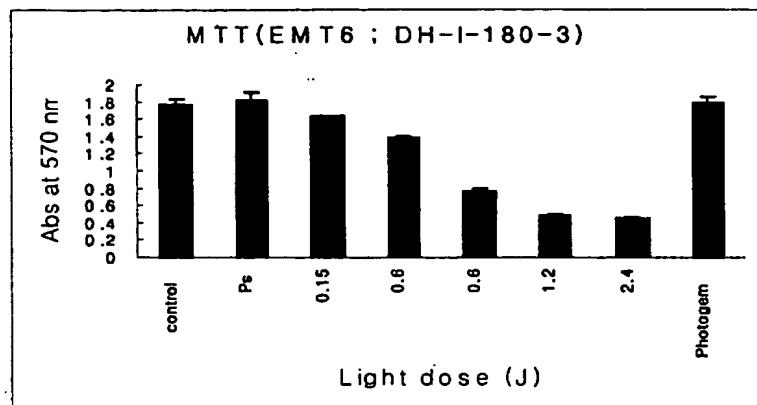


【도 6】

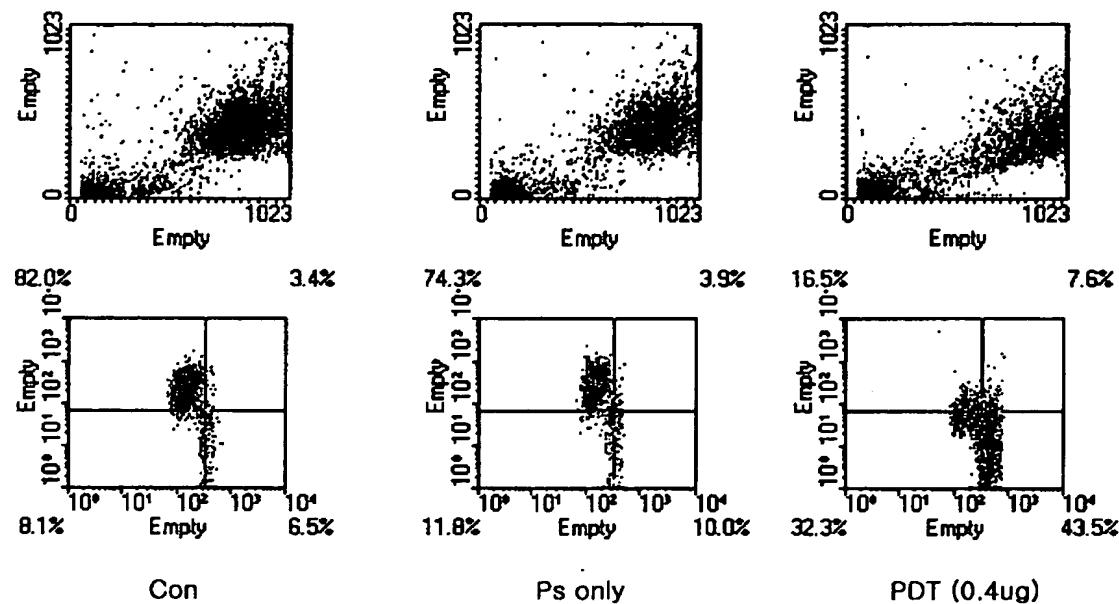


BEST AVAILABLE COPY

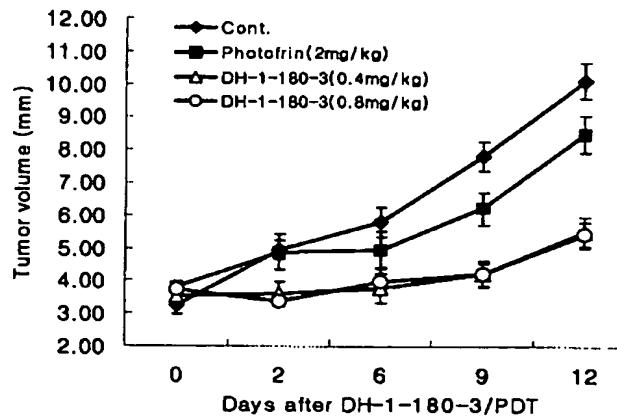
【도 7】



【도 8】



【도 9】



BEST AVAILABLE COPY

【도 10】

